

Efekat predtretmana sa L-NAME na glutation i glutation peroksidazu u strijatumu pacova na neurotoksičnost izazvanu parakvatom

**Mirjana Đukić¹, Milica Ninković², Ivana Stevanović², Katarina Ilić³,
Dragan Đurđević²**

¹ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

² Institut za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija

³ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Autor za korespondenciju: Dr sci Mirjana Đukić, profesor

e-mail: mirjana.djukic@pharmacy.bg.ac.rs

Telefon: +381 11 3951 308, Faks: +381 11 3972840

URL: <http://www.pharmacy.bg.ac.rs/fakultet/ljudi/nastavnik/64>.

Kratak sadržaj

Kontaktini herbicid parakvat (PK) je dipiridinsko jedinjenje, koje podleže redoks metabolizmu i svoju toksičnost ispoljava posredstvom povećanog stvaranja slobodnih radikala. Ciljni organi sistemskog toksičnog efekta PK kod čoveka su pluća i bubrezi. Mehanizam PK-indukovane neurotoksičnosti do sada još uvek nije u potpunosti rasvetljen.

Cilj našeg rada bio je da se ispita uloga azot oksida (NOx) u neurotoksičnosti PK, sa posebnim osvrtom na glutationski ciklus [glutation (GSH) i enzim glutation peroksidazu (GPx)]. U cilju da se istraži uloga NOx u oksidativnom stresu (OS) i / ili nitrosativnom stresu (NS), kao odgovoru na neurotoksičnost PK. U predtretmanu parakvatom koristili smo NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), neselektivni inhibitor azot oksid sintetaze (NOS), aplikovan je pre davanja PQ.

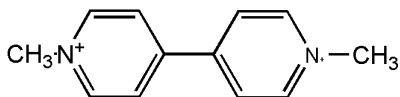
Studija je sprovedena na pacovima *Wistar* soja nasumice podeljenim u grupe (n = 8 za kontrolnu grupu i n = 24 za eksperimentalne grupe) u zavisnosti od tretmana. Testirana jedinjenja su intrastrijatalno (*i.s.*) aplikovana. Merenje sadržaja GSH i aktivnosti GPx izvršena su 30 min, 24 sata i 7 dana posle tretmana.

Parkinsonizam je kao simptom primećen samo u grupi pacova tretiranih PK - om. L-NAME je ispoljio zaštitni efekat kod životinja kod kojih je *i.s.* davan PK, što bi se moglo zaključiti na osnovu odsustva simptoma parkinsonizma i smanjenog OS/NS odgovora u strijatumu u grupi pretretiranoj sa L-NAME.

Ključne reči: parakvat, neurotoksičnost, strijatum, azot oksid, L-NAME.

Skraćenice: glutation, GSH; glutation peroksidaza, GPx; *i.s.*, intrastrijatalno; *i.p.*, intraperitonealno; MDA, malondialdehid; NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; NO_x, azotni oksid; NO₃⁻, nitrati; NS, nitrozativni stres; O₂, molekularni kiseonik; O₂^{•-}, superoksidni anjon radikal; OS, oksidativni stres; PK, parakvat; RAV, reaktivne azotove vrste; RKV, reaktivne kiseonične vrste; SOD, superoksidna dizmutaza.

Uvod



Profesionalno ili slučajno izlaganje visokim dozama pesticida može dovesti do trovanja ili smrtnog ishoda, bez obzira na put unosa u organizam (inhalacija, ingestija ili preko kože) (1). Parakvat (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridin) (PK), je brzo delujući kontaktni herbicid. Posebno je toksičan za pluća i bubrege, a izaziva i konvulzije (2). Toksičnost PK ostvaruje se narušavanjem ćelijskog integriteta, posredstvom stvaranja visoko reaktivnih radikala, kroz proces redoks kruženja u prisustvu molekularnog kiseonika (O₂) (3-5). Pošto toksične doze izazivaju oštećenja renalnih tubula, zbog neadekvatne ekskrecije dolazi do povećanja koncentracije PK u krvi i tkivima. Imajući u vidu hemijsku sličnost dipiridinskih jedinjenja sa hinonima (elektrofilna jedinjenja), koji ekskretovani u obliku konjugata sa glutationom (GSH) oštećuju renalne tubule, moguće je da se i konjugati PK sa GSH izlučuju preko bubrega (6).

Toksični efekat PK na molekularnom nivou pokrenut je stvaranjem slobodnih radikala (SR) kroz proces redukciono-oksidacionih (redoks) reakcija (7). Drugi aspekt toksičnosti PK ostvaruje se kroz iscrpljivanje enzima antioksidativne zaštite (katalaze, superoksid dizmutaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze - GPx), koji „uklanjaju“ reaktivne proizvode i utrošak ćelijskih izvora reduktivnih ekvivalenata, NADPH i GSH (donora elektrona), čime se remeti redoks homeostaza u ćeliji i promoviše stanje oksidativnog stresa (OS) (8, 9).

Dopaminergički neuroni su ciljna mesta neurotoksičnog efekta PK, zbog svoje značajne osetljivosti prema oksidativnom oštećenju, posredovanom reaktivnim vrstama kiseonika (RVK) (2, 10 - 12). Dopaminergički neuroni, lokalizovani u *substantia nigra* (SN), šalju svoje projekcije u strijatum (13).

Pored toga, izgleda da stimulacija N-metil-*d*-aspartatnih receptora (NMDA) glutamatom, koja je praćena ulaskom Ca²⁺ u ćeliju i NMDA receptor-posredovanim oslobađanjem azot oksida (NO_x) preko enzima azot oksid sintaze (NOS) ima značajnu ulogu u neurotoksičnosti PK (2, 14, 15). Parakvat stimuliše efluks glutamata, pokrećući tako ekscitotoksičnost, posredstvom reaktivnih vrsta azota (RAV) (2, 15).

NG-nitro-L-arginin metil estar (L-NAME) je kompetitivni nespecifični inhibitor azot oksid sintaze (NOS), te je moguće da smanjujući sintezu NO sprečava i razvoj OS/NS u neuronima (16). Nitrati (NO_3^-) su stabilni finalni metabolički produkti NO_x , a i drugih RAV (5, 17, 18). U cilju proučavanja uloge NO_x u neurotoksičnosti PK, testirali smo hipotezu da predtretman L-NAME-om može omogućiti razlikovanje efekata PKV od RAV na finalni odgovor strijatuma na PK - indukovanu neurotoksičnost i važnije od toga, da inhibicijom stvaranja NO_x može umanjiti oksidativno/nitrozativno oštećenje nervnih ćelija.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

Eksperimentalne životinje su tretirane u skladu sa vodičem za eksperimentalne studije, No. 282-12/2002 (Etički komitet Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija). Eksperimenti su izvođeni na odraslim mužjacima *Wistar* pacova težine oko 220 grama. Pacovi su bili podeljeni u tri grupe (dve kontrolne i jedna eksperimentalna) i smešteni u kavezima pod standardizovanim uslovima (temperatura sredine $23 \pm 2^\circ\text{C}$, relativna vlažnost od $55 \pm 3\%$ i ciklus svetlo/tama 13/11 sati) i imali su slobodan pristup hrani i vodi. Svi eksperimenti su rađeni posle sedam dana adaptacije životinja na laboratorijske uslove u periodu od 9 h ujutru do 13 h popodne.

Eksperimentalni dizajn

Testirane supstance su aplikovane u pojedinačnoj dozi, intrastrijatalno (*i.s.*) u finalnoj zapremini od 10 μL , da se nervno tkivo ne bi opteretilo volumenom. Posle adaptacije, pacovi su podeljeni u 5 grupa. Jedna grupa od 8 netretiranih životinja je odmah žrtvovana. Pacovi svih ostalih grupa su anestetizirani pentobarbital natrijumom [45 mg/kg telesne mase (TM)] intraperitonealno (*i.p.*) pre intrastrijatalne (*i.s.*) aplikacije sledećih supstanci: kontrolna grupa (n = 8) tretirana je sa 10 μL 0,9 % NaCl rastvora; PK grupa (n = 24) – životinje su trovane PK u pojedinačnoj dozi (2,5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$); L-NAME + PK grupa (n = 24) – životinje su pretretirane sa L-NAME u jednoj pojedinačnoj dozi (10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) 30 minuta pre davanja PK; i L-NAME grupa (n = 24) – životinje su tretirane sa L-NAME jednokratno (10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$).

Pacovi u svim eksperimentalnim grupama su dekapitovani nakon 30 minuta, 24 h i 7 dana (po 8 životinja u svakom terminu), a glavice su odmah zamrzavane u tečnom azotu i čuvane na -70°C do analize. Aplikacija PK, L-NAME i NaCl je vršena Hamiltonovim špricom na stereotaksičnom instrumentu za male laboratorijske životinje i prema odgovarajućim koordinatama za strijatum (koordinate: 8,4 mm iza bregme, 2,6 mm levo od srednje linije suture i 4,8 mm ventralno od dure) (19).

Od biohemijskih parametara sadržaj ukupnog glutaciona i aktivnost glutacion peroksidaze mereni su obostrano u strijatumu posle 30 minuta, jednog dana i 7 dana nakon tretmana.

Reagensi

Sve hemikalije bile su analitičke čistoće. U studiji su korišćene sledeće supstance: Parakvat - Galokson® (200 g/L) (Galenika, Zemun, Srbija); Pentobarbital natrijum – Vetanarcol® (0,162 g/mL) (Werfft - Chemie, Vienna, Austria); Glutathione reductase (EC 1.6.4.2), Type III, from yeast [9001-48-3], Sigma Chemical Co (St Luis, MO, USA) – visoko rafinisana suspenzija u 3,6 M (NH₄)₂SO₄, na pH 7,0; 2500 U/1.6 mL (9,2 mg prot/mL – biuret) 170 U/mg proteina (1 jedinica redukuje 1 μmol GSSG/min, pH 7,6 na 25 °C); fiziološki rastvor (0,9 % NaCl) (Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija); glutation, glutation disulfid i NADPH (Boehringer Corp. - London, UK); NaNO₃ (Mallinckrodt Chemical Works - St. Louis, MO, USA); natrijum glukonat, etilendiamintetra sirćetna kiselina – EDTA (Sigma - Sr. Louis, USA); Natrijum fosfat - Na₂HPO₄, kalijum dihidrogen fosfat - KH₂PO₄, glicerol, metanol, acetonitril, trihlorsirćetna kiselina, tiobarbiturna kiselina (Merck - Darmstadt, Germany); natrijum tetraborat i borna kiselina (Zorka - Šabac, Srbija); karbonatni pufer (50 mM, pH 10,2), (SeRAV, Feinbiochemica - Heidelberg, New York); NaNO₃, Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, USA); natrijum glukonat, Merck (Darmstadt, Germany); glicerol, Merck (Darmstadt, Germany); metanol, HPLC čistoće, Merck (Darmstadt, Germany); acetonitril, HPLC čistoće, Merck (Darmstadt, Germany); standardni puferi pH 7,0 i pH 10,0, HI 7710P (Vila do Conde, Portugal). Dejonizovana voda je pravljena preko Millipor mili-Q sistema za prečišćavanje vode (Waters - Millipore, Milford, MA, USA).

Priprema tkiva i merenja

Homogenati selektivno osetljivih moždanih struktura pripremani su kao što je opisano ranije (20). Izolovan je ipsi i kontralateralni strijatum i sve vreme procedure držani su na ledu. Izolovani preseki su prebačeni u saharozni medijum (0.25 mol/L saharoza, 0.1 mmol/L EDTA u natrijum-kalijum fosfatnom puferu, pH 7) i homogenizovani u staklenom homogenizeru s teflonskim tučkom na 800 obrtaja/min (Tehnica Zelezniki Manufacturing, Slovenia). Nakon dva uzastopna centrifugiranja na 1000 obrtaja u minuti, u trajanju od 15 min na 4°C, odvojen je supernatant, a grubi talog je resuspendovan u 1 mL dejonizovane vode. Solubilizacija subcelularnih membrana u hipotoničnom rastvoru postignuta je Pasterovom pipetom konstantnim mešanjem od 1h. Zatim su homogenati centrifugirani na 2000 obrtaja u minuti 15 min na 4 °C, a dobijeni supernatant je korišćen za analizu. Za merenje ukupne koncentracije proteina metodom po *Lowr*-iju korišćen je kao standard kristalizovani serumski albumin govečeta (21).

Glutation (GSH) - Za određivanje ukupnog GSH korišćena je reciklirajuća reakcija oksidacije GSH do GSSG u prisustvu *Elman*-ovog reagensa (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina, DTNB) i specifičnost delovanja enzima glutation reduktaze prema supstratu GSSG, kada se on redukuje u GSH (22). Rezultati su izražavani u nmol GSH na mg proteina.

Glutation peroksidaza (GPx) - Ova metoda se zasniva na indirektnom određivanju aktivnosti GPx spektrofotometrijskim merenjem potrošnje NADPH na

340 nm. Enzim GPx katalizuje redukciju lipidnih hidroperoksida u alkohol/H₂O korišćenjem redukujućih ekvivalenata GSH, koji tako postaju oksidovani. Regeneracija potrošenog GSH dešava se redukcijom GSSG u GSH, katalizovano enzimom GR, koja koristi NADPH kao donor redukujućih ekvivalenata. Za redukciju svakog mola GSSG potreban je jedan mol NADPH (23). Rezultati su predstavljeni u jedinicama (units, U) aktivnosti enzima po mg proteina: U GPx / mg proteina.

Statistička analiza

Podaci su analizirani korišćenjem verzije *Statistica software 7.0 (Stat Soft, Inc.)*. Poređenje parametara OS sa kontrolnim vrednostima urađeno je korišćenjem nezavisnog *Student T*-testa. Razlike su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$.

Rezultati

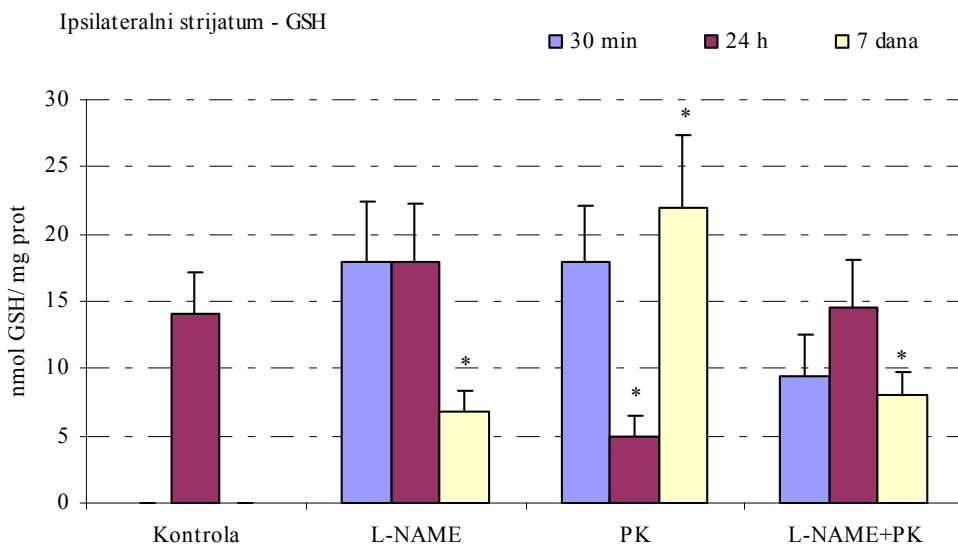
Ne postoji značajna razlika u analiziranim parametrima OS unutar kontrolnih grupa [intaktne (rezultati nisu predstavljeni) i lažno-operisane], što govori da sam tretman nije doveo do oksidativne povrede moždanog tkiva. Rezultati analiziranih biohemijskih parametara predstavljeni su grafički za obe strane strijatuma, a kontrolne vrednosti se odnose na lažno-operisane pacove. Rezultati pokazuju da je trend oksidativnih promena u strijatumu sličan za obe strane, kako tretirane (ipsilateralne) tako i suprotne, kontralateralne strane.

Eksperimentalne grupe životinja su aktivno praćene od tretmana do žrtvovanja.

Sadržaj ukupnog GSH bio je snižen višestruko 24h posle davanja PK, dok je sedmog dana bio povećan 134% u odnosu na kontrolne vrednosti. Sedam dana nakon davanja samo L-NAME ili kombinacije L-NAME sa PK, sadržaj GSH bio je obostrano smanjen u strijatumu u odnosu na kontrolne vrednosti (Grafikoni 1, 2).

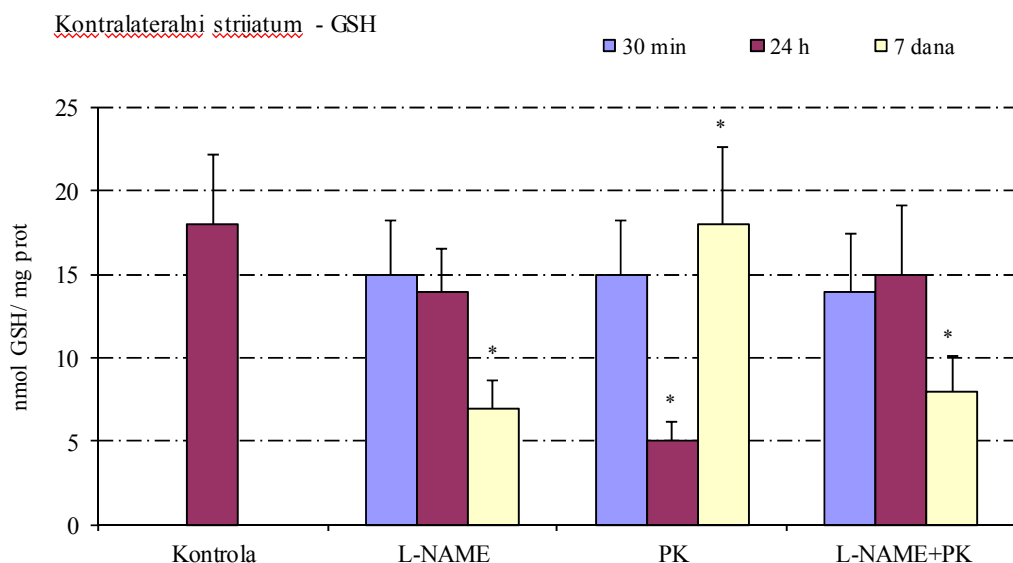
Grafik 1: Sadržaj ukupnog glutationa u ipsilateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije parakvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: nmol GSH/mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti smatrane su statistički značajnim za $p < 0.05$ (*Student T-test*).



Grafik 2: Sadržaj ukupnog glutationa u kontralateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije parakvata

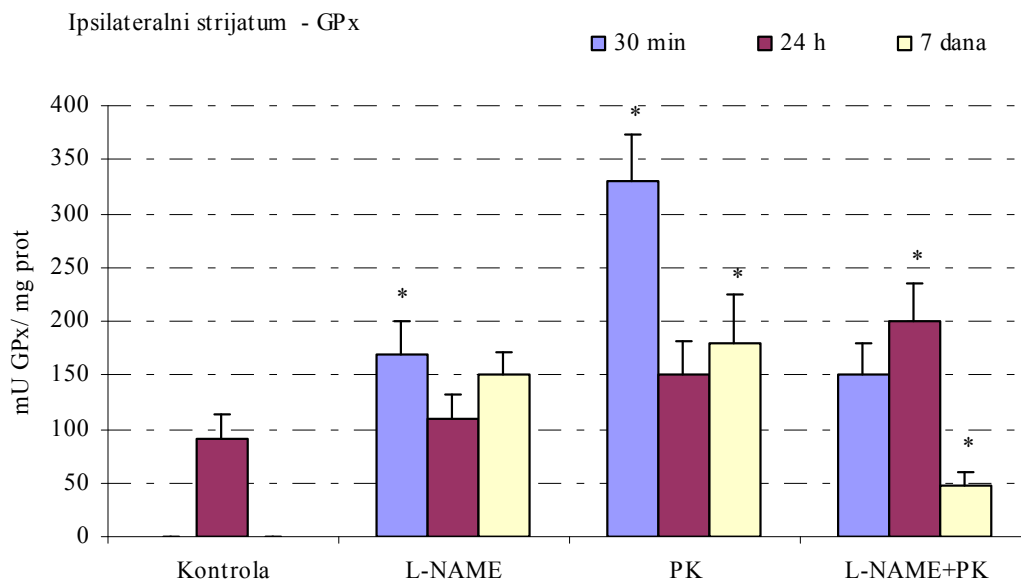
Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: nmol GSH /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0.05$ (*Student T-test*).



Aktivnost GPx bila je značajno povećana u strijatumu ($p < 0,05$) obostrano 30 minuta od aplikacije PK, nakon čega je postojao blagi trend sniženja aktivnosti enzima, mada je aktivnost GPx i dalje bila značajno viša od kontrolnih vrednosti (Grafikoni 3, 4). Davanje inhibitora NOS je takođe povećala aktivnost enzima bilo u kombinaciji sa PK, ili samog L-NAME, osim u terminu 7 dana nakon davanja L-NAME+PK, kada je zabeleženo značajno smanjenje aktivnosti enzima od čak 70% u odnosu na kontrolu (Grafik 3).

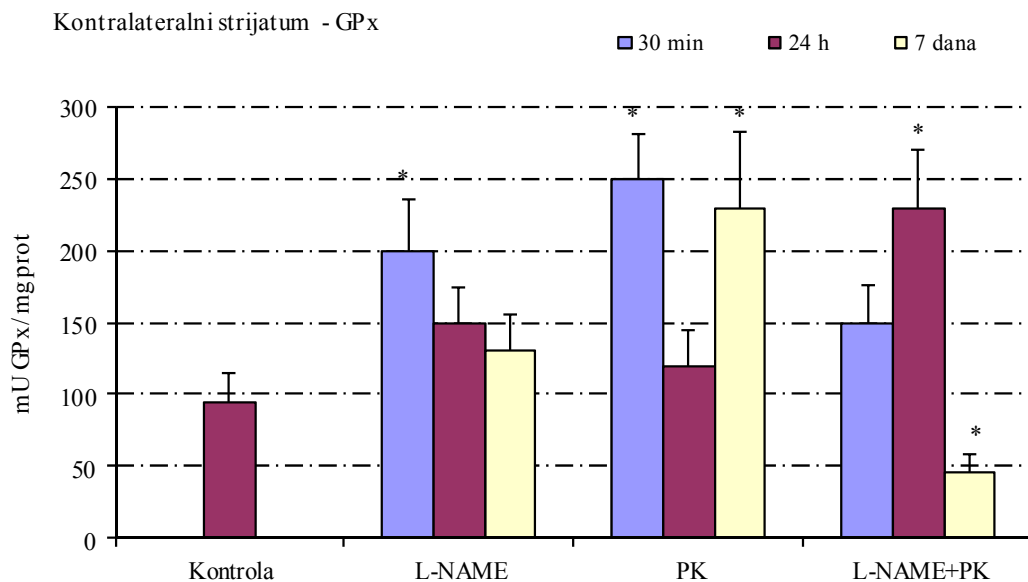
Grafik 3: Aktivnost glutation peroksidaze u ipsilateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije parakvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: mU GPx/mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0.05$ (*Student T-test*).



Grafik 4: Aktivnost glutation peroksidaze u kontralateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije parakvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: mU GPx/mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0.05$ (*Student T-test*).



Diskusija

Bihevioralne promene koje su se javile kod životinja nakon trovanja PK upućuju na povećanu osetljivost nigrostrijatnog dopaminskog sistema. Kod životinja je registrovano rotaciono kretanje kontralateralno od strane aplikovanja PK. Ovi simptomi su reverzibilnog karaktera i povukli su se 2-3 h od trovanja. Ovakav nalaz je u skladu sa literaturnim podacima u kojima je uočeno da se nakon *i.s.* davanja PK *Wistar* pacovima ostvaruju neurohemijski, morfološki i bihevioralni efekti (24).

U mehanizmu delovanja PK na ćelije nigrostrijatnog sistema od značaja su i neurotoksični efekti PK, koji nastaju kao posledica povećanog efluksa glutamata u sinaptičku pukotinu. Kao rezultat stimulacije receptora, putem glutamata, čiji efluks stimuliše PK, povećava se koncentracija Ca^{2+} u ćeliji, što kao rezultat ima aktivaciju NOS i stvaranje NO^{\bullet} iz L-arginina (25, 26). Nastali NO^{\bullet} sa $\text{O}_2^{\bullet-}$, gradi peroksinitritni anjon (ONOO^-), koji ostvaruje dodatne neurotoksične efekte (27, 28).

30 minuta nakon *i.s.* aplikovanja PK u strijatumu, obostrano je registrovano značajno povećanje aktivnosti GPx ($p < 0,05$); (Grafikoni 3, 4). Ovako visoka aktivnost enzima nije bila praćena promenama u sadržaju ukupnog GSH (Grafikoni 1, 2). Međutim, nakon 24h u strijatumu obostrano aktivnost GPx, premda povećana u odnosu na kontrolu, značajno je bila niža u odnosu na rani termin posmatranja (30 minuta). Ovo smanjenje aktivnosti enzima, bilo je praćeno značajnim smanjenjem koncentracije ukupnog GSH. Smanjenje sadržaja GSH koje se odražava i na aktivnost GPx, može da se objasni i stvaranjem s-nitrozoglutationa (29). Smanjeni sadržaj ukupnog GSH u analiziranim strukturama mozga, ukazuje na nepotpunu oksidativnu zaštitu ćelije. U nastojanju ćelije da održi energetska ravnotežu, moguće je da jedan deo GSH podlegne razgradnji, jer razgradnjom svakog molekula GSH, oslobađaju se dva molekula ATP-a, što bi moglo biti jedno od objašnjenja sniženog sadržaja GSH u strijatumu nakon *i.s.* PK (30). Ovaj sniženi sadržaj GSH obostrano u strijatumu ukazuje i na njegovo aktivno učešće u antioksidativnoj zaštiti prilikom trovanja PK (Grafikoni 1, 2). Takođe, moguće je da se smanjenje javlja i kao posledica konjugovanja PK sa GSH, koji bi mogao da smanji toksični efekat PK u moždanoj strukturi, s obzirom da bihevioralne promene nisu registrovane nakon davanja PK reverzibilnog karaktera. Sedmog dana nakon trovanja PK, sadržaj GSH se značajno povećao, što se može tumačiti kompenzatornim povratnim mehanizmom koji je uslovljen povećanom potrebom ćelije da se zaštiti od OS-a.

Enzim GPx odgovoran je za uklanjanje H_2O_2 , prekursora hidroksilnog radikala (odgovornog za inicijalnu fazu lipidne peroksidacije). Donor elektrona u reakcijama koje katalizuje GPx je GSH. U mozgu se najveći deo nastalog H_2O_2 (niske koncentracije) uklanja GPx, koja je distribuirana u glija i dopaminergičnim ćelijama ili nervnim završecima u SN i *Caudo-putamenu*.

Primenom L-NAME, kompetitivnog antagoniste enzima NOS, blokira se sinteza NO u neuronima i glija ćelijama, i dolazi do nagomilavanja L-arginina, prekursora u biosintezi NO^{\bullet} , ali i ornitina, prekursora glutaminske kiseline. Iz ovog proizilazi da

inhibicija NOS delimično može doprineti nastanku ekscitotoksičnosti, ali nasuprot ovome i povećanoj antioksidativnoj zaštiti. Poznato da je glutaminska kiselina zajedno sa cisteinom i glicinom uključena u biosintezu GSH što objašnjava povećanu aktivnost GPx već 30 minuta nakon davanja L-NAME obostrano u strijatumu pacova (Grafikoni 3, 4).

Inhibicija NOS davanjem L-NAME utiče na sadržaj GSH. U našem istraživanju zapaženo je da posle trovanja PK, kada sinteza NO[•] nije bila inhibirana, u periodu od 24 h do sedmog dana, postojao je porast ukupnog GSH, za razliku od preostalih tretmana, kada je (ne)posredno ometena sinteza NO (Grafik 2).

Za razliku od trovanja PK, predtretman sa L-NAME doprinosi postepenom snižavanju aktivnosti enzima GPx (odgovornog za uklanjanje lipidnih hidroperoksida i H₂O₂), a posebno niska aktivnost GPx izmerena je sedmog dana (Grafik 3). Izmereni smanjeni sadržaj GSH je u tom slučaju verovatno bio posledica energetske iscrpljenosti tkiva, kao i manjka donora redukcionih ekvivalenata (NADPH), odnosno verovatno je aktivnost G-6PDH u ovakvim uslovima razvijenog OS, determinišući faktor. Smanjenom sintezom NO, koja nastaje nakon delovanja L-NAME, smanjuje se i aktivacija transkripcijskih faktora u ćeliji, od kojih je NFκB značajan u stimulisanju gena za sintezu GSH.

Povećanje aktivnosti GPx u ipsi i kontralateralnom strijatumu nakon delovanja L-NAME upućuje na značaj metabolizma NO u aktiviranju ovog enzima, odnosno ka usmeravanju redoks stanja prema stvaranju vodonik peroksida, što je praćeno i očuvanim sadržajem ukupnog GSH. Smanjeni sadržaj GSH obostrano u strijatumu životinja koje su dobile samo L-NAME 7. dana, može biti i posledica vremenski ograničenog delovanja L-NAME, nakon čega je obnovljeno stvaranje NO, za koji je pokazano da je medijator aktivacije faktora transkripcije koji indukuju aktivnost GPx. Povećana aktivnost enzima obostrano u strijatumu posle 30 minuta i 24 h u grupama koje su pre PK dobile L-NAME, upućuje na zaštitini efekat ovog inhibitora sinteze NO. Značajno smanjenje aktivnosti GPx koje se javlja nakon 30 minuta, u odnosu na promene koje se javljaju nakon delovanja samog PK, upućuje na verovatni značaj sintetisanog NO u aktivaciji GPx, ili pak, u indukciji gena za sintezu enzima GPx.

Rezultati naših istraživanja potvrđuju uključenost NO_x u mehanizme neurotoksičnosti PK. Pacovi trovani PK ispoljili su simptome parkinsonizma, a što se tiče biohemijske analize parametara glutationskog ciklusa, pokazano je da je aktivnost GPx bila značajno povećana u ovoj grupi. Praćenje aktivnosti GPx se može smatrati veoma osetljivim i pouzdanim indikatorom oksidativnog-nitrozativnog stresa, kao odgovora na neurotoksični efekat PK. Takođe, ovom studijom je pokazano da je posle 24 časa došlo do energetskog kolapsa i masivnog narušavanja redoks homeostaze nervnih ćelija strijatuma u grupi trovanoj PK. Odsustvo bihejvioralnih promena u grupi životinja koje su predtretirane sa L-NAME pre *i.s.* davanja PK, kao i stabilizacija ćelijskih funkcija 24 časa (nije izmeren pad aktivnosti GPx i pad sadržaja GSH kao u DK grupi) potvrđuje protektivnu ulogu ovog nekompetitivnog inhibitora NOS u neurotoksičnosti izazvane PK.

Zahvalnost

Zahvaljujemo recenzentima na sugestijama. Ovaj rad je podržan sredstvima sa projekata Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (Projekat No. III 41018) i Ministarstva odbrane Republike Srbije (Projekat No. MMA/06-10/B.3).

Literatura

1. Badah H, Nazimek T, Kaminska IA. Pesticide content in drinking water samples collected from orchard areas in central Poland. *Ann Agric Environ Med* 2007; 14: 109-14.
2. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Sánchez Navarro A, Bastos ML, CaRAVlho F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicol* 2006; 27: 1110-22.
3. Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicol* 2002; 180: 65-77.
4. Timbrell JA. Principles of biochemical toxicology. Taylor & Francis Ltd, London, 2000.
5. Czerniczyniec A, Karadayian AG, Bustamante J, Cutrera RA, Lores-Arnaiz S. [Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction.](#) *Free Radic Biol Med* 2011; 51(7): 1428-36.
6. Ray S, Sengupta A, Ray A. [Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats.](#) *Indian J Exp Biol* 2007; 45(5): 432-8.
7. Morán JM, Ortiz-Ortiz MA, Ruiz-Mesa LM, Niso-Santano M, Bravosanpedro JM, Sánchez RG, González-Polo RA, Fuentes JM. [Effect of paraquat exposure on nitric oxide-responsive genes in rat mesencephalic cells.](#) *Nitric Oxide* 2010; 23(1): 51-9.
8. Bajo-Grañeras R, Sanchez D, Gutierrez G, González C, Do Carmo S, Rassart E, Ganfornina MD. [Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum.](#) *J Neurochem* 2011; 117(6): 949-60.
9. Rappold PM, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, Sen N, Javitch JA, Tieu K. [Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3.](#) *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(51): 20766-71.
10. Bonne-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA: Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 134: 52-6.
11. Fitsanakis V, Amarnath V, Moore J, Montine K, Zhang J, Montine T. Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate complexes in pesticides. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1714-23.
12. Lotharius J, O'Malley KL. The parkinsonism-inducing drug 1- methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *J Biol Chem* 2000; 275: 38581-8.
13. Zeng X, Shen H, Zhao J, Cai Q, Wang C, Xu Q. [Long-term changes in morphology, D\(2\)R expression and targets of regenerated dopaminergic terminals in the striatum after a partial lesion in the substantia nigra in the rat.](#) *Brain Res* 2012.
14. Miranda M, de Bruin VMS, Vale MR, Viana G. Lipid Peroxidation and Nitrite plus Nitrate Levels in Brain Tissue from Patients with Alzheimer's Disease. *Gerontol* 2000; 46: 179-84.
15. Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimarub S, Saitoa O, Shiono H. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain Res* 2003; 976: 243-52.

16. Talas DU, Nayci A, Polat G, Atis S, Comelakoglu U, Bagdatoglu OT, Bagdatoglu C. The effects of dexamethasone on lipid peroxidation and nitric oxide levels on the healing of tracheal anastomoses: an experimental study in rats. *Pharm Res* 2002; 46: 265-71.
17. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modifications of biomolecules. *Mol Aspects Med* 1998; 19: 221-357.
18. Rubbo H, Donnell VO. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insight. *Toxicol* 2005; 208: 305-17.
19. König JFR, Klippel RA. The rat brain. The Williams and Wilkins Company A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Baltimore, USA. 1963: 53.
20. Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterisation of rat brain synaptic plasma membrane. *J Neurochem* 1974; 2: 281-90.
21. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
22. Anderson ME. Tissue glutathione. The DTNB-GSSG reductase recycling assay for total glutathione (GSH+1/2 GSSG). In: Greenwald RA. ed. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press Inc, Florida, 1986: 317-23.
23. Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 77: 1525-35.
24. Liou HH, Chen RC, Tsai YF, Chen WP, Chang YC, Tsai MC. Effects on the substantia nigra of the Wistar rats: neurochemical, histological and behavioral studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 137: 134-41.
25. Gathwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TINS* 1991; 14: 60-7.
26. Knowels R, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
27. Brecht D, Snyder S. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 3-11.
28. Gupta S, Rogers L, Smith C. Biliary excretion of lysosomal enzymes, iron and oxidized protein in Fischer-344 and Sprague-Dawley rats and the effect of diquat and acetaminophen. *Toxicol Applied Pharmacol* 1994; 125(1): 42-50.
29. Murphy M, Sies H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10860-4.
30. Gibson D, Brackett D, Squires R, Balla A, Lerner M, McCay P, Pennington L. Evidence that the large loss of glutathione observed in ischemia/reperfusion of the small intestine is not due to oxidation to glutathione disulfide. *Free Radic Biol Med* 1993; 14(4): 427-33.

Dozvola Etičkog odbora za rad sa životinjama

Autori su obavljali eksperiment u skladu sa institucionalnom politikom humanog i etičkog tretmana eksperimentalnih životinja, i spremni su da dostave o tome podatke i originalne materijale, ako se traži. Eksperimentalne životinje su tretirane u skladu sa Smernicama za proučavanje životinja, br 282-12/2002 (Etički komitet Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija).

Izjava o originalnosti rada

Rezultati predstavljeni u rukopisu nisu objavljeni ili predati za objavljivanje negde drugde.

Izjava o sukobu interesa

Autori izjavljuju da nema sukoba interesa.

The effect of pre-treatment with l-name on glutathione and glutathione peroxidase in paraquat-induced neurotoxicity in rat striatum

Mirjana Đukić¹, Milica Ninković², Ivana Stevanović², Katarina Ilić³,
Dragan Đurđević²

¹ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology
„Academician Danilo Soldatovic”, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

² Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Crnotravska 17, 11000
Belgrade, Serbia

³ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Author for Correspondence: Mirjana Đukic, e-mail: mirjana.djukic@pharmacy.bg.ac.rs
Phone (office): +381 11 3951 308 fax: +381 11 3972840
URL: <http://www.pharmacy.bg.ac.rs/fakultet/ljudi/nastavnik/64>.

Summary

Contact herbicide paraquat (DQ) is bipyridylium compound, which undergoes redox metabolism; hence enlarged in humans radical production mediated its toxicity. Target organs of systemic effect of PQ poisoning are lung and kidney. The mechanism of PQ-induced neurotoxicity is not elucidated till now.

The objective of our study was to examine the role of nitric oxide (NO_x) in PQ-induced neurotoxicity, primarily focusing on glutathione cycles [total glutathione content (GSH) and glutathione peroxidase (GPx) activity]. In order to investigate the role of NO_x in oxidative stress (OS) and/or nitrosative stress (NS) response to PQ neurotoxicity, we used NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) in the pretreatment of PQ administration.

Study was conducted on Wistar rats randomly divided in groups (n=8 for controls and n=24 for experimental groups) depending on the applied treatments. The tested compounds were intrastrially (*i.s.*) administered. Measuring of GSH content and GPx activity was performed at 30 min, 24 hours and 7 days after treatments.

Parkinsonism's like symptoms were observed only in the group of rats treated with PQ. The L-NAME protected animals from PQ-induced neurotoxicity, which could be concluded from the absence of Parkinsonism's like symptoms and reduced OS/NS response in the striatum of rats pretreated with L-NAME.

Key words: paraquat, neurotoxicity, striatum, nitric oxide, L-NAME.
